

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40188-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/03412	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/03/2001	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/03/2000
Anmelder FRANZ, Wolfgang M.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/85 A61K48/00 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 19469 A (BIOTRANSPLANT INC) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 10, Zeile 1 - Zeile 4	1,16,30
X	WOBUS A ET AL: "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes" J MOL CELL CARDIOL. , Bd. 29, Nr. 6, Juni 1997 (1997-06), Seiten 1525-1539, XP001030714 Abbildungen 1,4,5; Tabelle 1	24,25
X	WO 97 17937 A (KATUS H A ;ROTHMANN THOMAS (DE); FRANZ WOLFGANG M (DE)) 22. Mai 1997 (1997-05-22) in der Anmeldung erwähnt Beispiele 6-8,10-12	24,25
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/10/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lonnoy, 0

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 16163 A (INST PFLANZENGENETIK & KULTUR ;WOBUS ANNA M (DE); FRANZ WOLFGANG M) 30. Mai 1996 (1996-05-30) in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ---	1-31
Y	GAINS P ET AL: "pIRES-CD4T, A DICISTRONIC EXPRESSION VECTOR FOR MACS- OR FACS-BASED SELECTION OF TRANSFECTED CELLS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 26, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 683-688, XP001010486 ISSN: 0736-6205 Abbildungen 1-3 ---	1-31
A	MEDIN J ET AL: "A bicistronic therapeutic retroviral vector enables sorting of transduced CD34+ cells and corrects the enzyme deficiency in cells from Gaucher patients" BLOOD, Bd. 87, Nr. 5, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 1754-1762, XP001030719 Abbildung 1 ---	1-6
A	US 5 602 301 A (FIELD LOREN J) 11. Februar 1997 (1997-02-11) ---	
A	KLUG M ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" J CLIN INVEST, Bd. 98, Nr. 1, 1. Juli 1996 (1996-07-01), Seiten 216-224, XP002180457 ---	
A	WO 99 39571 A (HASEGAWA KAZUhide ;NABESHIMA YUICHI (JP); SUGIYAMA TOMOYASU (JP);) 12. August 1999 (1999-08-12) ---	
A	GAINER A L ET AL: "IMPROVED SURVIVAL OF BIOLOGICALLY TRANSFECTED MOUSE ISLET ALLOGRAFTS EXPRESSING CTLA4-IG OR SOLUBLE FAS LIGAND" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 66, Nr. 2, 27. Juli 1998 (1998-07-27), Seiten 194-199, XP000877391 ISSN: 0041-1337 in der Anmeldung erwähnt --- -/--	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 00 28000 A (BROOK FRANCES ;GARDNER RICHARD (GB); ISIS INNOVATION (GB); WALDMAN) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Ansprüche 36-50 ---	1-6, 9-12, 16-18, 30,31
P,A	MULLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro" FASEB J, Bd. 14, Nr. 15, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 2540-2548, XP002180458 -----	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 01/03412

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9919469	A	22-04-1999	AU 1073899 A WO 9919469 A1	03-05-1999 22-04-1999
WO 9717937	A	22-05-1997	AU 1867297 A WO 9717937 A2 DE 19681032 D2 EP 0862644 A2 JP 2000500017 T	05-06-1997 22-05-1997 08-04-1999 09-09-1998 11-01-2000
WO 9616163	A	30-05-1996	DE 4441327 C1 WO 9616163 A2 EP 0787182 A2 US 5928943 A	09-11-1995 30-05-1996 06-08-1997 27-07-1999
US 5602301	A	11-02-1997	AU 688427 B2 AU 1097695 A AU 697666 B2 AU 5214198 A EP 0729506 A1 JP 9505471 T WO 9514079 A1 US 5733727 A	12-03-1998 06-06-1995 15-10-1998 19-03-1998 04-09-1996 03-06-1997 26-05-1995 31-03-1998
WO 9939571	A	12-08-1999	JP 11285333 A EP 1053677 A1 WO 9939571 A1	19-10-1999 22-11-2000 12-08-1999
WO 0028000	A	18-05-2000	AU 1058400 A EP 1127108 A2 WO 0028000 A2	29-05-2000 29-08-2001 18-05-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT VON DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER
z.H. Kinzebach, Werner
Sternwartstrasse 4
D-81679 München
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

Eing. - 8. Nov. 2001 (44.1 PCT)

Sternwartstr. 4 D-81679 München

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

31/10/2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

M/40188-PCT

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03412

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

26/03/2001

Anmelder

FRANZ, Wolfgang M.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungssämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{ter} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungssämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Geertruida Groeneveld-Van der Spek

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40188-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/03412	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/03/2001	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/03/2000
Anmelder FRANZ, Wolfgang M.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/EP 01/03412

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/85 A61K48/00 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
1) X	WO 99 19469 A (BIOTRANSPLANT INC) 22. April 1999 (1999-04-22) ✓ Seite 10, Zeile 1 - Zeile 4 ---	1,16,30
2) X	WOBUS A ET AL: "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes" J MOL CELL CARDIOL. Bd. 29, Nr. 6, Juni 1997 (1997-06), Seiten 1525-1539, XP001030714 Abbildungen 1,4,5; Tabelle 1 ---	24,25
3) X	WO 97 17937 A (KATUS H A ; ROTHMANN THOMAS (DE); FRANZ WOLFGANG M (DE)) 22. Mai 1997 (1997-05-22) in der Anmeldung erwähnt Beispiele 6-8,10-12 --- -/-	24,25

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/10/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lonnoy, 0

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
4) Y	WO 96 16163 A (INST PFLANZENGENETIK & KULTUR ; WOBUS ANNA M (DE); FRANZ WOLFGANG M) 30. Mai 1996 (1996-05-30) in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1	1-31
5) Y	GAINS P ET AL: "pIRES-CD4T, A DICISTRONIC EXPRESSION VECTOR FOR MACS- OR FACS-BASED SELECTION OF TRANSFECTED CELLS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 26, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 683-688, XP001010486 ISSN: 0736-6205 Abbildungen 1-3	1-31
6) A	MEDIN J ET AL: "A bicistronic therapeutic retroviral vector enables sorting of transduced CD34+ cells and corrects the enzyme deficiency in cells from Gaucher patients" BLOOD, Bd. 87, Nr. 5, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 1754-1762, XP001030719 Abbildung 1	1-6
7) A	US 5 602 301 A (FIELD LOREN J) 11. Februar 1997 (1997-02-11)	
8) A	KLUG M ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" J CLIN INVEST, Bd. 98, Nr. 1, 1. Juli 1996 (1996-07-01), Seiten 216-224, XP002180457	
9) A	WO 99 39571 A (HASEGAWA KAZUhide NABESHIMA YOUICHI (JP); SUGIYAMA TOMOYASU (JP);) 12. August 1999 (1999-08-12)	
10) A	GAINER A L ET AL: "IMPROVED SURVIVAL OF BIOLOGICALLY TRANSFECTED MOUSE ISLET ALLOGRAFTS EXPRESSING CTLA4-IG OR SOLUBLE FAS LIGAND" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 66, Nr. 2, 27. Juli 1998 (1998-07-27), Seiten 194-199, XP000877391 ISSN: 0041-1337 in der Anmeldung erwähnt	

-/--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
11) P,X	WO 00 28000 A (BROOK FRANCES ;GARDNER RICHARD (GB); ISIS INNOVATION (GB); WALDMAN) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Ansprüche 36-50 ---	1-6, 9-12, 16-18, 30,31
12) P,A	MULLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro" FASEB J, Bd. 14, Nr. 15, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 2540-2548, XP002180458 -----	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl die Ansprüche 29 und 30, soweit es sich um in vivo Methoden handelt, sich auf Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindungen/Zusammensetzungen.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ DI zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03412

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9919469	A	22-04-1999	AU	1073899 A	03-05-1999
			WO	9919469 A1	22-04-1999
WO 9717937	A	22-05-1997	AU	1867297 A	05-06-1997
			WO	9717937 A2	22-05-1997
			DE	19681032 D2	08-04-1999
			EP	0862644 A2	09-09-1998
			JP	2000500017 T	11-01-2000
WO 9616163	A	30-05-1996	DE	4441327 C1	09-11-1995
			WO	9616163 A2	30-05-1996
			EP	0787182 A2	06-08-1997
			US	5928943 A	27-07-1999
US 5602301	A	11-02-1997	AU	688427 B2	12-03-1998
			AU	1097695 A	06-06-1995
			AU	697666 B2	15-10-1998
			AU	5214198 A	19-03-1998
			EP	0729506 A1	04-09-1996
			JP	9505471 T	03-06-1997
			WO	9514079 A1	26-05-1995
			US	5733727 A	31-03-1998
WO 9939571	A	12-08-1999	JP	11285333 A	19-10-1999
			EP	1053677 A1	22-11-2000
			WO	9939571 A1	12-08-1999
WO 0028000	A	18-05-2000	AU	1058400 A	29-05-2000
			EP	1127108 A2	29-08-2001
			WO	0028000 A2	18-05-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

6

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KINZEBACH, Werner
Reitstötter, Kinzebach & Partner
Sternwartstr. 4
81679 München
ALLEMAGNEf
D

Date of mailing (day/month/year) 27 September 2001 (27.09.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference M/40188-PCT			
International application No. PCT/EP01/03412	International filing date (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01)	Priority date (day/month/year) 24 March 2000 (24.03.00)	
Applicant FRANZ, Wolfgang, M.			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 27 September 2001 (27.09.01) under No. WO 01/71006

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

5

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

13 Aug 2001

KINZEBACH, Werner
Reitstötter, Kinzebach & Partner
Sternwartstr. 4
81679 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 06 August 2001 (06.08.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M/40188-PCT	
International application No. PCT/EP01/03412	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant FRANZ, Wolfgang, M.	International filing date (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01) Priority date (day/month/year) 24 March 2000 (24.03.00)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
24 Marc 2000 (24.03.00)	100 14 690.2	DE	19 July 2001 (19.07.01)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Magda BOUACHA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



10/049825

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. September 2001 (27.09.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/71006 A3

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/85,
A61K 48/00, G01N 33/569, C12N 5/10, A01K 67/027

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: FRANZ, Wolfgang, M. [DE/DE]; Gautingerstr.
15, 82234 Wessling (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03412

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter,
Kinzebach & Partner, Sternwartstr. 4, 81679 München
(DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. März 2001 (26.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

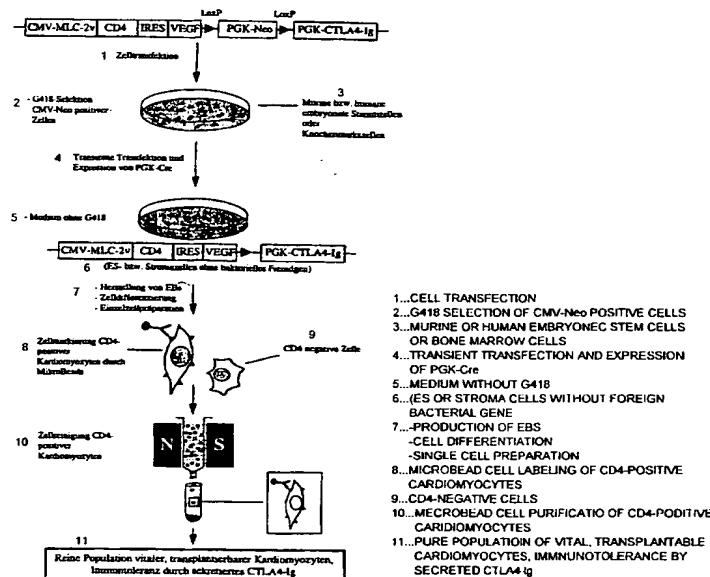
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 14 690.2 24. März 2000 (24.03.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING IN VITRO DIFFERENTIATED SOMATIC CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG IN VITO DIFFERENZIIERTER KÖRPERZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to an expression cassette that comprises, under the genetic control of an organ- or tissue-specific promoter and optionally of one or more other regulatory elements 3' downstream of the promoter, the coding nucleotide sequence of at least one non-immunogen receptor localized on the cell surface. The invention further relates to the vectors produced therefrom, to the host cells containing said vectors, to a method for purifying differentiated somatic cells using said constructs and to the use of said somatic cells in therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Expressionskassette, die unter der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen, an der Zelloberfläche lokalisierenden

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/71006 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

18. April 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/85 A61K48/00 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/19469 A (BIOTRANSPLANT INC) 22 April 1999 (1999-04-22) page 10, line 1 - line 4 ---	1, 16, 30
X	WOBUS A ET AL: "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes" J MOL CELL CARDIOL. , vol. 29, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 1525-1539, XP001030714 figures 1,4,5; table 1 ---	24, 25
X	WO 97 17937 A (KATUS H A ; ROTHMANN THOMAS (DE); FRANZ WOLFGANG M (DE)) 22 May 1997 (1997-05-22) cited in the application examples 6-8, 10-12 --- -/--	24, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2001

Date of mailing of the international search report

31/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, 0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/EP 01/03412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 16163 A (INST PFLANZENGENETIK & KULTUR ;WOBUS ANNA M (DE); FRANZ WOLFGANG M) 30 May 1996 (1996-05-30) cited in the application figure 1	1-31
Y	--- GAINS P ET AL: "pIRES-CD4T, A DICISTRONIC EXPRESSION VECTOR FOR MACS- OR FACS-BASED SELECTION OF TRANSFECTED CELLS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 26, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 683-688, XP001010486 ISSN: 0736-6205 figures 1-3	1-31
A	--- MEDIN J ET AL: "A bicistronic therapeutic retroviral vector enables sorting of transduced CD34+ cells and corrects the enzyme deficiency in cells from Gaucher patients" BLOOD, vol. 87, no. 5, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 1754-1762, XP001030719 figure 1	1-6
A	--- US 5 602 301 A (FIELD LOREN J) 11 February 1997 (1997-02-11)	
A	--- KLUG M ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" J CLIN INVEST, vol. 98, no. 1, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 216-224, XP002180457	
A	--- WO 99 39571 A (HASEGAWA KAZUhide ;NABESHIMA YUICHI (JP); SUGIYAMA TOMOYASU (JP);) 12 August 1999 (1999-08-12)	
A	--- GAINER A L ET AL: "IMPROVED SURVIVAL OF BIOLISTICALLY TRANSFECTED MOUSE ISLET ALLOGRAFTS EXPRESSING CTLA4-IG OR SOLUBLE FAS LIGAND" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 66, no. 2, 27 July 1998 (1998-07-27), pages 194-199, XP000877391 ISSN: 0041-1337 cited in the application --- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 28000 A (BROOK FRANCES ;GARDNER RICHARD (GB); ISIS INNOVATION (GB); WALDMAN) 18 May 2000 (2000-05-18) claims 36-50 ---	1-6, 9-12, 16-18, 30,31
P,A	MULLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro" FASEB J, vol. 14, no. 15, December 2000 (2000-12), pages 2540-2548, XP002180458 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/03412

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9919469	A	22-04-1999	AU 1073899 A WO 9919469 A1	03-05-1999 22-04-1999
WO 9717937	A	22-05-1997	AU 1867297 A WO 9717937 A2 DE 19681032 D2 EP 0862644 A2 JP 2000500017 T	05-06-1997 22-05-1997 08-04-1999 09-09-1998 11-01-2000
WO 9616163	A	30-05-1996	DE 4441327 C1 WO 9616163 A2 EP 0787182 A2 US 5928943 A	09-11-1995 30-05-1996 06-08-1997 27-07-1999
US 5602301	A	11-02-1997	AU 688427 B2 AU 1097695 A AU 697666 B2 AU 5214198 A EP 0729506 A1 JP 9505471 T WO 9514079 A1 US 5733727 A	12-03-1998 06-06-1995 15-10-1998 19-03-1998 04-09-1996 03-06-1997 26-05-1995 31-03-1998
WO 9939571	A	12-08-1999	JP 11285333 A EP 1053677 A1 WO 9939571 A1	19-10-1999 22-11-2000 12-08-1999
WO 0028000	A	18-05-2000	AU 1058400 A EP 1127108 A2 WO 0028000 A2	29-05-2000 29-08-2001 18-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 01/03412

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/85 A61K48/00 G01N33/569 C12N5/10 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	WO 99 19469 A (BIOTRANSPLANT INC) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 10, Zeile 1 - Zeile 4 ---	1,16,30
X	WOBUS A ET AL: "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes" J MOL CELL CARDIOL., Bd. 29, Nr. 6, Juni 1997 (1997-06), Seiten 1525-1539, XP001030714 Abbildungen 1,4,5; Tabelle 1 ---	24,25
X	WO 97 17937 A (KATUS H A ;ROTHMANN THOMAS (DE); FRANZ WOLFGANG M (DE)) 22. Mai 1997 (1997-05-22) in der Anmeldung erwähnt Beispiele 6-8,10-12 ---	24,25
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/10/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lonnoy, 0

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 16163 A (INST PFLANZENGENETIK & KULTUR ;WOBUS ANNA M (DE); FRANZ WOLFGANG M) 30. Mai 1996 (1996-05-30) in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ---	1-31
Y	GAINS P ET AL: "pIRES-CD4T, A DICISTRONIC EXPRESSION VECTOR FOR MACS- OR FACS-BASED SELECTION OF TRANSFECTED CELLS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 26, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 683-688, XP001010486 ISSN: 0736-6205 Abbildungen 1-3 ---	1-31
A	MEDIN J ET AL: "A bicistronic therapeutic retroviral vector enables sorting of transduced CD34+ cells and corrects the enzyme deficiency in cells from Gaucher patients" BLOOD, Bd. 87, Nr. 5, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 1754-1762, XP001030719 Abbildung 1 ---	1-6
A	US 5 602 301 A (FIELD LOREN J) 11. Februar 1997 (1997-02-11) ---	
A	KLUG M ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" J CLIN INVEST, Bd. 98, Nr. 1, 1. Juli 1996 (1996-07-01), Seiten 216-224, XP002180457 ---	
A	WO 99 39571 A (HASEGAWA KAZUhide ;NABESHIMA YUICHI (JP); SUGIYAMA TOMOYASU (JP);) 12. August 1999 (1999-08-12) ---	
A	GAINER A L ET AL: "IMPROVED SURVIVAL OF BIOLOGICALLY TRANSFECTED MOUSE ISLET ALLOGRAFTS EXPRESSING CTLA4-IG OR SOLUBLE FAS LIGAND" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 66, Nr. 2, 27. Juli 1998 (1998-07-27), Seiten 194-199, XP000877391 ISSN: 0041-1337 in der Anmeldung erwähnt --- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 00 28000 A (BROOK FRANCES ;GARDNER RICHARD (GB); ISIS INNOVATION (GB); WALDMAN) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Ansprüche 36-50 ---	1-6, 9-12, 16-18, 30,31
P,A	MULLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro" FASEB J, Bd. 14, Nr. 15, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 2540-2548, XP002180458 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03412

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9919469 A	22-04-1999	AU 1073899 A	03-05-1999
		WO 9919469 A1	22-04-1999
WO 9717937 A	22-05-1997	AU 1867297 A	05-06-1997
		WO 9717937 A2	22-05-1997
		DE 19681032 D2	08-04-1999
		EP 0862644 A2	09-09-1998
		JP 2000500017 T	11-01-2000
WO 9616163 A	30-05-1996	DE 4441327 C1	09-11-1995
		WO 9616163 A2	30-05-1996
		EP 0787182 A2	06-08-1997
		US 5928943 A	27-07-1999
US 5602301 A	11-02-1997	AU 688427 B2	12-03-1998
		AU 1097695 A	06-06-1995
		AU 697666 B2	15-10-1998
		AU 5214198 A	19-03-1998
		EP 0729506 A1	04-09-1996
		JP 9505471 T	03-06-1997
		WO 9514079 A1	26-05-1995
		US 5733727 A	31-03-1998
WO 9939571 A	12-08-1999	JP 11285333 A	19-10-1999
		EP 1053677 A1	22-11-2000
		WO 9939571 A1	12-08-1999
WO 0028000 A	18-05-2000	AU 1058400 A	29-05-2000
		EP 1127108 A2	29-08-2001
		WO 0028000 A2	18-05-2000

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/71006 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/63

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03412

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. März 2001 (26.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 14 690.2 24. März 2000 (24.03.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: FRANZ, Wolfgang, M. [DE/DE]; Gautingerstr.
15, 82234 Wessling (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter,
Kinzebach & Partner, Sternwartstr. 4, 81679 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING IN VITRO DIFFERENTIATED SOMATIC CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG IN VITO DIFFERENZIIERTER KÖRPERZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to an expression cassette that comprises, under the genetic control of an organ- or tissue-specific promoter and optionally of one or more other regulatory elements 3' downstream of the promoter, the coding nucleotide sequence of at least one non-immunogen receptor localized on the cell surface. The invention further relates to the vectors produced therefrom, to the host cells containing said vectors, to a method for purifying differentiated somatic cells using said constructs and to the use of said somatic cells in therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Expressionskassette, die unter der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen, an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptors umfasst, die daraus hergestellten Vektoren, die diese Vektoren enthaltenden Wirtszellen, Verfahren zur Reinigung differenzierter Körperzellen unter Verwendung dieser Konstrukte und die therapeutische Anwendung dieser Körperzellen.



WO 01/71006 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verfahren zur Isolierung in vit^o differenzierter Körperzellen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Verfahren zur Herstellung und selektiven Isolierung differenzierter, transgener, somatischer Körperzellen, wie z.B. ventrikulärer Kardiomyocyten, die dazu erforderlichen genetischen Konstrukte und die damit hergestellten Vektoren, diese Vektoren enthaltende Wirtszellen und die therapeutische Verwendung der transgenen differenzierten Körperzellen.

Es besteht auf verschiedensten Gebieten der Medizin, wie z.B. der Neurologie, der Dermatologie, der Osteologie oder der Kardiologie ein Bedarf an allogenen oder syngenem Ersatzgewebe oder Ersatzzellmaterial. Man befaßt sich deshalb intensiv mit der Gewinnung differenzierter somatischer Körperzellen aus pluripotenten Progenitorzellen, wie z.B. embryonalen Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind der Wissenschaft schon seit geraumer Zeit bekannt. Am Modell der Maus wurden sie charakterisiert. Sie besitzen die außerordentliche Fähigkeit, sich im wesentlichen in jede der 210 verschiedenen Zelltypen des menschlichen Körpers zu differenzieren.

25

Thomson et al (1998), Science 282, 1145-1147 ist es kürzlich gelungen, menschliche ES-Zellen aus menschlichen Blastozysten zu isolieren. In ihren physiologischen Eigenschaften gleichen sie denen der Maus. Mit der Isolierung menschlicher ES-Zellen rückt eine erfolgreiche zellvermittelte Gentherapie am Menschen in greifbare Nähe. Die Bedeutung dieser Entwicklung soll am Beispiel der Kardiologie kurz veranschaulicht werden.

35

Herzinsuffizienz beschreibt die Unfähigkeit des Herzens, Blut und Sauerstoff in einem Maße, das den Bedürfnissen des Körpers gerecht wird, zu den Organen zu transportieren. 1996 starben in Deutschland mehr Menschen an chronischer Herzinsuffizienz als

an akutem Herzinfarkt. Hauptursache dafür ist, daß zu wenig Spenderherzen für eine lebensrettende Herztransplantation zur Verfügung stehen und die Wartezeit derzeit bei etwa neun bis zwölf Monaten liegt.

5

Die derzeit zur Verfügung stehenden Alternativmethoden zur Herztransplantation sind nur begrenzt erfolgreich bzw. nicht weit genug entwickelt. Zur Myokardentlastung und Kontraktionsunterstützung wird im klinischen Alltag in einem ersten Schritt vor allem die medikamentöse Therapie der chronischen Herzinsuffizienz angewandt. Es folgen operative Maßnahmen, wie die Myokardresektion nach Batista, nach welcher geschädigtes Gewebe mechanisch entfernt wird, die Kardiomyoplastie, d.h. der Unterstützung der Herzfunktion durch körpereigene Skelettmuskulatur sowie die Implantation eines Kunstherzes. In der experimentellen Phase befindet sich immer noch die umstrittene Xenotransplantation, also die Verpflanzung eines Spenderherzens aus dem Schwein oder dem Affen in den Menschen. Letztere trifft nicht nur auf ethische Einwände, sondern auch auf medizinische Risiken, die mit einer Xenotransplantation verbunden sind. Zum einen kann ein Überspringen artfremder Krankheitserreger auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden. Andererseits setzt eine Xenotransplantation immer noch die Verwendung immunsupprimierender Medikamente voraus, die zwar das transplantierte Herz vor einer Immunreaktion schützen, den Gesamtorganismus aber gegenüber alltäglichen Keimen und der Entstehung von Krebs verwundbar machen.

Die wohl erfolgversprechendste Alternative zur Herztransplantation wäre die autologe Zelltransplantation. In der Kardiologie versteht man darunter die Injektion von gesunden Zellen direkt in das geschädigte Herzareal.

Kardiomyozyten verlieren im Gegensatz zur quergestreiften Skelettmuskulatur kurz nach der Geburt die Fähigkeit sich zu teilen, so daß bei einer Verletzung oder Schädigung des Myokards irreversible Zell- und Funktionsverluste auftreten. Im Falle

eines Herzinfarktes bedeutet dies den Ersatz von Herzmuskulatur durch Bindegewebe mit Bildung einer Narbe. Dem könnte durch die Transplantation von Ersatz-Muskelzellen entgegengewirkt werden.

5 Die technische Durchführbarkeit der zellulären Transplantation in Versuchstiere, wie Maus, Ratte und Hund, konnte nicht nur durch die Transplantation von fetalen, neonatalen und adulten Kardiomyozyten, sondern auch durch die Injektion organfremder Zellen wie, Myoblasten, Skelettmuskel-Satellitenzellen und kardialen Tumorzellen bewiesen werden (Klug et al., (1996) J.Clin. Invest.98, 216); Koh et al., (1995) J. Clin. Invest,96, 2034; Schwarz et al., (1998)Z. Kardiol, 87, 1). Histologisch-morphologische Studien belegen, daß sowohl Myoblasten, als auch fetale Kardiomyozyten myokardiale Transplantate mit interzellulären Verbindungen, wie "Gap Junctions" und Desmosomen, ausbilden und 8 bis 10 Wochen überleben (Koh et al., a.a.O; Soonpaa et al., (1994) Science, 264, 98). Koh und Mitarbeiter konnten zeigen, daß genetisch modifizierte, transplantierte Myoblasten im Empfängermyokard rekombinante Wachstumsfaktoren langfristig exprimieren und dadurch im Grenzbereich zwischen Transplantat und Empfängermyokard die endotheliale DNA-Synthese mit nachfolgender Angiogenese induzieren können (Koh et al., (1995) J. Clin. Invest. 95, 114). Teilweise ungeklärt ist, ob die Zelltransplantate wirklich positive Effekte auf das Myokard ausüben oder nicht längerfristig etwa elektrische und strukturelle Instabilitäten verursachen. Problematisch bei der Gewinnung von Kardiomyozyten ist die Manipulation der Zellen. Zwar gelingt es, Kardiomyozyten zurück in den Zellzyklus zu zwingen, z.B. durch das Einfügen von Tumorgenen, jedoch auf Kosten der physiologischen Zelleigenschaften. Die für ventrikuläre Kardiomyozyten typischen elektrophysiologischen, pharmakologischen und immunhistologischen Charaktersitika gehen dadurch verloren.

Grundvoraussetzung für den Erfolg eines Zelltransplantationsansatzes ist das Vorhandensein einer homogenen Zellpopulation. ES-Zellen besitzen neben ihrer Fähigkeit sich in jedweden Zelltyp zu differenzieren, auch einen besonderen Nachteil. Werden

sie in undifferenziertem Zustand in Mäuse injiziert, so kommt es zur Entstehung von Tumoren, sogenannten Teratokarzinomen. Bevor ES-Zellen therapeutisch genutzt werden können, muß daher sichergestellt sein, daß alle Zellen so ausdifferenziert sind, daß keine Gefahr vor einer ungehemmten Vermehrung der Zellen oder der Bildung ungewollter Gewebstypen besteht. Eine stringente Aufreinigung des gewünschten Zelltyps, im Falle der Kardiologie, von Herzmuskelzellen, ist daher zur Sicherheit des Empfängers eine absolute Notwendigkeit.

Loren J. Field (J. Clin. Invest. (1996), 98, 216) gelang es, spontan differenzierende Kardiomyozyten mit einem Reinheitsgrad von über 99% anzureichern. Um dieses Ziel zu erreichen, führten sie zunächst ein Antibiotika-Resistenzgen in die murinen ES-Zellen ein. Dieses war so ausgelegt, daß es ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert wird. Nachdem den ES-Zellen Zeit gegeben wurde, sich zu differenzieren und nachdem durch den Zusatz von genügend Antibiotikum alle Zellen ohne Resistenzgen abgetötet waren, gelang es, eine im wesentlichen reine Population von Kardiomyozyten zu erhalten. Nach der Transplantation dieser Zellen in Mäusemyokardien, konnten sie bis zu einem Zeitraum von mehr als 7 Wochen nachgewiesen werden. Die Hauptnachteile dieser Methode bestehen vor allem in der Toxizität des verwendeten G418-enthaltenden Mediums, der geringen Ausbeute der so erhaltenen Zellen und der Tatsache, daß es sich bei den beschriebenen Zellen nicht um humane sondern murine Zellen handelt.

Obwohl Kardiomyozytentransplantation am Tiermodell mehrfach erfolgreich durchgeführt wurden, ist eine erfolgsversprechende Durchführung am Menschen aus obigen Gründen und vor allem aufgrund der Nichtverfügbarkeit menschlicher ventrikulärer Kardiomyozyten nicht möglich. Mit ähnlichen Problemen ist bei der Gewinnung und Transplantation anderer Körperzellen zu rechnen.

Kurze Beschreibung der Erfindung:

Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung verbesserte Mittel und Verfahren zur Gewinnung von differenzierter Körperzellen zur Verfügung zu stellen. Insbesondere war es Aufgabe, verbesserte Mittel und Verfahren zur Gewinnung differenzierter ventrikulärer Kardiomyocyten bereitzustellen.

Obige Aufgabe wurde überraschenderweise durch Bereitstellung einer neuartigen Expressionskassette für die genetische Modifikation der zu isolierenden Körperzellen, bzw. pluripoten Vorläuferzellen der Körperzellen gelöst. Diese Expressionskassette, welche dazu geeignet ist, an pluripotente Vorläuferzellen eines Säugers verabreicht zu werden, z.B. als Bestandteil eines Expressionsvektors, ist dadurch gekennzeichnet, dass sie unter der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor, funktional bzw. operativ verknüpft, die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nach Induktion der Zelldifferenzierung exprimierten an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptors umfasst. Dabei ist der exprimierte Rezeptor für einen Säuger, an welchen die differenzierten Zellen verabreicht werden sollen, nicht immunogen.

Durch die Kombination von organ-oder gewebespezifischem Promotor und an der Zelloberfläche lokalisierenden Rezeptor, dessen organ- oder gewebespezifische Expression von obigem Promotor in der gewünschten Subpopulation differenzierter Körperzellen gesteuert wird, wird eine schnelle, schonende und selektive Isolierung einer spezifischen Zellpopulation unter Ausnutzung der Bindungsaffinität des Rezeptors zu einem korrespondierenden Bindungspartner bzw. Liganden ermöglicht.

Detaillierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung:

Je nach zu isolieren gewünschter differenzierter Zellpopulation kann der Fachmann den jeweils geeignetsten zell- oder organ-spezifischen Promotor und einen passenden Rezeptor auswählen.

- 5 Als nichtlimitierende Beispiele für geeignete Promotoren sind zu nennen:

Promotor	Spezifität	Fundstelle
MLC-2	Herzmuskel	PCT/DE 96/02181
10 SMHC	Glatte Gefäßmuskulatur	DE-A-196 20 308
Insulinpromotor	Beta-Zellen	
AFP-Promotor	Leber	

- 15 Auf die Offenbarung obiger Fundstellen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Entscheidend für die Auswahl des Rezeptors bzw. dessen extrazellulären Bereich, ist, dass dieser nach Expression auf der Zelloberfläche Bindungsaffinität zu einem Liganden besitzt und 20 geringe Immunogenität in einem späteren Empfängerorganismus aufweist. Vorzugsweise sollte der Rezeptor, bzw. dessen extrazellulärer Bereich, "nicht-immunogen" im Empfängerorganismus sein.

25 Ein "nicht-immunogener" erfindungsgemäß brauchbarer Rezeptor, bzw. dessen extrazellulärer Bereich, sollte wenigstens eine der folgenden Eigenschaften aufweisen:

- a) er wird in exprimierter Form auf der differenzieren Körperzelle vom Immunsystem eines Säugers, an welchen die 30 erfindungsgemäß differenzierten Körperzellen verabreicht werden sollen, nicht als "körperfremd", insbesondere als "körpereigen", erkannt;
- b) er wird unter nativen Bedingungen, d.h. unter normalen 35 Entwicklungsbedingungen, auf undifferenzierten pluripotenten Vorläuferzellen eines Säugers, insbesondere desjenigen

Säugers, an welchen später die erfindungsgemäß differenzierten Zellen verabreicht werden sollen, nicht exprimiert;

- c) er wird von organ- oder gewebespezifischen Zellen eines Säugers, welche mit Hilfe der Expressionskassette genetisch verändert werden sollen, unter nativen Bedingungen im wesentlichen nicht oder erst in einen späteren Entwicklungsstadium der Zellen exprimiert.

- Das Rezeptormolekül kann entweder in seiner ursprünglichen, nativen Form oder in einer genetisch veränderten Form als "funktionales Äquivalent" exprimiert werden. Ein "funktionales Äquivalent" des Rezeptors besitzt weiterhin die qualitativ vergleichbare Bindungseigenschaften mit dem nativen Molekül, kann aber beispielsweise Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweisen (Additionen, Substitutionen, Insertionen, Deletionen), durch welche beispielsweise die Bindungsaffinität des Rezeptors zum korrespondierenden Liganden erhöht oder erniedrigt wird. Denkbar sind insbesondere auch Änderungen, durch welche die intrazelluläre Domäne des nativen Rezeptors teilweise oder ganz deletiert ist.

Besonders brauchbare Rezeptoren sind solche, die nativ von Zellsystem des körpereigenen Immunsystems, z.B. von B- oder T-Zellen, exprimiert werden. Als Beispiele können hierzu genannt werden:

CD2 bis CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD 15s, CD16, CDW17, CD18 bis CD21, CD25, CD27 bis CD32, CD38 bis CD40, CD41a, CD41b, CD44, CD45, CD45RA, CD47, CD49b, d, e, und f, CD56, CD58, CD59, CD61, CD63, CD64, CD69, CD74, CD78, CD79b, CD80, CD81, CD83, CD86, CD87, CD89, CD90, CD92, CD93, CD95, CD97, CD98, CD100, CD101, CD122, CD128, CD130, CD132, CD134, CD137, CD152, CD154, CD158a, CD161 bis CD163, CD165, ICAM-1, LFA-1, LFA-3, CTLA-4, B7, hB7-RP1, BSL2vc, BSL3, ICOS, PD-1, HLA-Antigene, und der gleichen.

Als weiteres geeignetes Molekül kann der Desmoglein-Rezeptor genannt werden.

Bevorzugt ist der CD4 Rezeptor.

Als Liganden eignen sich die natürlichen Bindungspartner obiger
Rezeptormoleküle oder Immunglobuline, wie insbesondere monoklo-
5 nale Antikörper oder Fragmente davon.

Ein Beispiel für ein besonders geeignetes Ligand/Rezeptorpaar
ist:

10	Rezeptor	Ligand
	CD4	Anti-CD4-Antikörper

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Expres-
sionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende
15 Nucleotidsequenz in einem polycistronischen, vorzugsweise bi-
cistronischen, Gen enthalten ist, welches außerdem die kodie-
rende Sequenz für wenigstens ein weiteres Genprodukt, ausge-
wählt unter einem Markergen und einem ersten therapeutisches
20 Gen, umfasst. Vorzugsweise umfasst das bi-cistronische Gen die
regulatorische Sequenz einer Internal Ribosome Entry Side (IRE-
S) (z.B. kommerziell erhältlich von der Firma Clontech). Ein
derartiges polycistronisches Konstrukt bietet den zusätzlichen
überraschenden Vorteil, daß unter der genetischen Kontrolle des
25 vorgeschalteten Promotors eine gleichzeitige Expression des
Rezeptors und des weiteren Gens erfolgt. Ist das weitere Gen
ein Markergen, wie z.B. EGFP (grün fluoreszierendes Protein),
so erleichtert dies die Charakterisierung der mit Hilfe des
Rezeptors isolierten Zellen. Ist das weitere Gen ein therapeu-
30 tisches Gen, so wird dessen gewebe- oder organspezifische Ex-
pression gewährleistet und dadurch das Risiko unerwünschter
Nebenwirkungen durch unkontrollierte Expression in anderen Ge-
weben oder Organen praktisch ausgeschlossen.

35 Neben dem Promotor können in der Expressionskassette gewünsch-
tenfalls weitere regulatorische Elemente enthalten sein, wie

Amplifikationssignale, Enhancer, Polyadenylierungssequenzen, Replikationsursprünge, Reportergene, Markergene und dergleichen.

5 Bevorzugt verwendet man in den erfindungsgemäßen Konstrukten als Rezeptormolekül ein Oberflächenantigen, das immunologische Affinität zu einem Immunglobulin-Molekül besitzt. Das Immunglobulinmolekül ist dabei vorzugsweise ein monoklonaler Anti-Rezeptor-Antikörper oder ein Rezeptor-bindendes Fragment, wie z.B.
10 ein Fab oder F(ab')₂ oder Fv Fragment, davon.

Zur leichteren Isolierung der Rezeptor-exprimierenden Zellen kann der Ligand, wie z.B. der Antikörper, in immobilisierter Form, z.B. gebunden an einen festen Träger, oder verknüpft mit
15 paramagnetischen Mikrokügelchen, sogenannte "Mikrobeads", vorliegen.

Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet man als Oberflächenantigen das CD4-Antigen oder ein verkürztes Fragment davon, vorzugsweise ein um die intrazelluläre Domäne verkürztes Molekül, das
20 somit weiterhin die Transmembran- und extrazelluläre Domäne umfasst.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Expressionskassette einen selektierbaren Marker, wie z.B. ein Resistenzgen
25 enthalten. Grundsätzlich sind beliebige an sich bekannte Resistenzgene einsetzbar. Als Beispiele können insbesondere Antibiotika-Resistenzgene, wie das Neomycin- und das Hygromycin-Resistenzgen, genannt werden.

30 Vorzugsweise liegt das Resistenzgen und dessen zugeordneter Promotor in einer reversibel integrierten Form vor und kann somit zu einem geeigneten Zeitpunkt, jedenfalls vor der therapeutischen Anwendung der Zellen, wieder entfernt werden.
35 Die reversible Einbindung von Resistenzgen und dessen Promotor erreicht man beispielsweise, indem man diese durch LoxP-Sequenzen flankiert (LoxP-Promotor-Resistenzgen-LoxP). Durch trans-

iente Transfektion der Resistenzgen-haltigen Zellen und Expression von PKG-Cre (z.B. beschrieben in Cellemann et al., (1998) Transg. Res. 7, 105) kann damit das Fremdgen spezifisch entfernt werden.

5

Als Beispiel für eine erfindungsgemäß brauchbare Gruppe erster therapeutischer Gene sind Gene für Angiogenese-Faktoren zu nennen. Bevorzugte Vertreter dieser Gruppe sind das vascular endothelial growth factor (VEGF) Gen, das basic fibroblast growth factor (bFGF) Gen, das acidic fibroblast growth factor (aFGF) Gen, das Angiopoietin-, Activin- sowie das Follicostatin-Gen. Diese sind vorzugsweise Bestandteil des oben erwähnten bi-cistronischen Gens.

10

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Konstrukt außerdem ein zweites therapeutisches Gen, insbesondere ein Immunsuppressionsgen.

Vorzugsweise ist dieses Gen in eigenständiger Form, d.h. mit
20 eine eigenen Promotor, enthalten. Derartige Konstrukte bieten den Vorteil, daß eine lokale immunsuppressive Wirkung gentherapeutisch vermittelt werden kann. Das immunsupprimierende Genprodukt kann dabei membranständig oder, vorzugsweise, in sezernierter Form vorliegen. Ein geeignetes sezerniertes immunsupprimierendes Genprodukt ist das CTLA4-Ig-Fusionsprotein.
25

Aufgrund der bevorzugten therapeutischen Verwendung der erfindungsgemäßen Zellisolate beim Menschen sind insbesondere solche Konstrukte vorteilhaft, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.
30

"Humanisierte" Genprodukte sind dabei solche, bei denen zur Verringerung ihrer Immunogenität nicht-menschliche Teilsequenzbereiche durch entsprechenden mensch-typische Sequenzbereiche ersetzt wurden.

35

Eine besonders bevorzugte Gruppe von erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist dadurch gekennzeichnet, dass als organ- oder

gewebespezifischer Promotor der ventrikelspezifische Myosin-Leichte-Kette-2 (MLC-2v) Promotor verwendet wird. Dieser Promotor und geeignete Varianten davon sind in der PCT/DE 96/02181 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

5 Beispiele für spezielle Formen bevorzugter Expressionskassetten sind Konstrukte, welche in 5'-3'- Richtung wenigstens eine der folgenden Teilsequenzenfolgen umfassen:

- a) MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- 10 b) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;
- c) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein; und
- 15 d) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, LoxP, PGK-Promotor, Resistenzgen, LoxP, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein;

dabei ist der CMV-Enhancer ein regulatorisches Element aus dem
20 Cytomegalovirus und der PGK-Promotor die Promotorsequenz für das Enzym Phosphoglycerinkinase. Auch diese bevorzugten Konstrukte umfassen zweckmäßig kodierende Sequenzen, welche im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Vektoren, wie z.B. Plasmide oder virale Konstrukte, Phagen, Phasmide, Phagemide, Transposons, Cosmide, oder Liposome, umfassend wenigstens eine der oben beschriebenen Expressionskassetten. Bevorzugt verwendet man virale, insbesondere adenovirale, Konstrukte oder
30 Liposomenpräparate. Bevorzugte MLC-2-haltige Vektoren sind in der oben bezeichneten PCT/DE 96/02181 beschrieben.

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Isolierung in vitro differenzierter organ- oder gewebespezifischen
35 Körperzellen eines Säugers, wobei man

- a) in pluripotente Vorläuferzellen, insbesondere ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und

Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen organ- oder gewebespezifischen Expressionsvektor gemäß obiger Definition einbringt;

b) transgenpositive Zellen selektioniert;

5 c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene Resistenzgene entfernt;

d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer die gewünschten organ- oder gewebespezifischen Körperzellen umfassenden Zellpopulation induziert und erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und

10 e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten Körperzellen mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinholt.

15 Gegenstand ist insbesondere auch ein Verfahren zur Herstellung von ventrikulären Kardiomyozyten, wobei man

a) in pluripotente Vorläuferzellen, insbesondere ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen oben beschriebenen ventrikelspezifischen Expressionsvektor einbringt;

b) transgenpositive Zellen selektioniert;

c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene reversibel integrierte Resistenzgene entfernt;

25 d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer Kardiomyocyten umfassenden Zellpopulation induziert und erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und

e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten ventrikulären Kardiomyozyten mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinigt.

Eine Variante obiger Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man als reversibel integrierte Resistenzgene LoxP-flankierte Resistenzgene verwendet, und zur Entfernung dieser die Zellen mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor transient transfiziert.

In einer weiteren Variante obigen Verfahrens werden embryonale Stammzellen eingesetzt, die in an sich bekannter Weise gewonnen wurden aus

- a) Blastozysten oder
- 5 b) enukleierten Oocyten, in welche der Kern einer differenzierten adulten somatischen Körperzelle transferiert wurde.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden die pluripotenten Vorläuferzellen mit einem erfindungsgemäßen Expressionskonstrukt genetisch manipuliert. Beispielsweise kann man eine Zellpopulation unter Anwendung von Elektroporation in an sich bekannter Weise transfizieren. Dies eignet sich besonders bei klonal isolierbaren Zellen. Ist eine klonale Isolierung erschwert, so
15 kann man beispielsweise mit Hilfe viraler Vektoren, wie z.B. adenoviraler Konstrukte, hohe Gentransferraten in die pluripotenten Zellen erreichen. Nach Induktion der Differenzierung wird, unter Kontrolle des organ- oder gewebespezifischen Promotors, der Rezeptor spezifisch in der gewünschten Subpopulation der differenzierten Zellen exprimiert. Unter Ausnutzung der spezifischen Wechselwirkung zwischen Rezeptor auf der Zelloberfläche und einem zugeordneten Liganden kann dann die Isolierung der gewünschten differenzierten Zellen erfolgen.

25 Vorzugsweise sind bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Rezeptor-spezifischen Liganden an paramagnetische Mikrobeads gekoppelt, so daß die Ligand-markierten Zellen in einem Magnetfeld von nichtmarkierten Zellen getrennt werden.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich mit pluripotenten Stammzellen beliebiger Säuger, wie z.B. Mensch, Maus, Ratte, Schwein, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, durchführbar.

Obige Verfahren finden insbesondere Anwendung zur Herstellung körpereigener (autologer) humaner Körperzellen, wobei man die pluripotenten Vorläuferzellen aus einem autologen menschlichen Spender gewinnt.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere transgene somatische Körperzellen, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren. Diese finden insbesondere Verwendung zur, vorzugsweise autologen, Zelltransplantation oder zur Gentherapie, wie insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation, bei verschiedensten Krankheitszuständen. Nichtlimitierende Beispiele für mögliche Indikationen sind die ischämische und dilatative Kardiomyopathie.

10 Gegenstand sind insbesondere Kardiomyocyten mit einem elektrophysiologisch ventrikulären Eigenschaftsspektrum, d.h. einem für ventrikuläre Kardiomyocyten typischen Membranpotential von ca. -70 mV, einer Potentiallänge von ca. 118 ms und einem Overshoot von ca. 34 mV, wobei Carbachol als Agonist des Muscarinischen
15 Rezeptors keinen Effekt auf das Membranpotential und die Länge des Aktionspotentials hat. Typisch für ventrikuläre Kardiomyocyten ist außerdem ein Andauern des Aktionspotentials nach Behandlung der Zellen mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin (vgl. auch Figur 2).

20 Die Herstellung und Gewinnung von Herzmuskelzellen aus verschiedenen pluripotenten Progenitorzellen wird nun im folgenden Abschnitt eingehender beschrieben.

25 a) Herstellung aus ES-Zellen:

Das derzeitige Wissen über die Gewinnung und Handhabung von ES-Zellen stammt zum größten Teil aus dem Studien muriner ES-Zellen. Sie wurden erstmals 1981 aus einem Maus-Embryo im 100-
30 Zellstadium gewonnen. Der Embryo in diesem Entwicklungszeitpunkt wird als Blastozyste bezeichnet. Er mißt wenige Millimeter und besteht aus einer Hohlkugel, die an einer Stelle nach innen zur inneren Zellmasse verdickt ist. Unter natürlichen Verhältnissen bildet sich im Uterus daraus der Fötus. Wird die
35 Blastozyste allerdings in einer Petrischale angewachsen, so kollabiert die äußere Membran und die innere Zellmasse fängt an sich zu teilen. In diesem Stadium können die Zellen über einen

unbegrenzten Zeitraum gehalten werden. Ihre Pluripotenz, d.h. ihre Fähigkeit sich in nahezu jeden Zelltyp zu differenzieren bleibt weiterhin erhalten.

5 Die ES-Zellen behalten solange ihren undifferenzierten Zustand bei, solange sie in ihrem Nährmedium das von sogenannten "Feeder"-Zellen sezernierte Cytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor) vorfinden. Werden die "Feeder"-Zellen bzw. LIF entfernt und wird verhindert, daß sich die ES-Zellen am Substrat anheften, z.B. durch Kultur der ES-Zellen auf Bakterienplatten oder
10 in sogenannten "hängenden Tropfen", so beginnen sie sich zu differenzieren. Während der Differenzierung kommt es zur Ausbildung sogenannter "Embryoid Bodies". Die Richtung der Differenzierung bleibt zunächst unvorhersehbar, jedoch ist das Repertoire sich in vitro differenzierender Zellen deutlich geringer,
15 als nach Injektion in eine Blastozyste; vermutlich hervorgerufen durch die unterschiedlich chemisch definierte Umgebung der Zellen. Werden die ES-Zellen in Gegenwart von Stromazellen angewachsen, so kommt es zu einer verstärkten Ausbildung hämatopoetischer Zellen. Das gleiche tritt ein, wenn dem Kulturmedium Methylcellulose beigefügt wird. Die Zugabe von Retinsäure (RA) führt je nach Konzentration und Zeitpunkt der Stimulation zur Anhäufung kardialer oder neuronaler Zellen. Entsprechende Methoden sind z.B. in der DE 44 41 327 oder der WO 96/16163 beschrieben.
20
25

Von kleineren Abweichungen im Arbeitsprotokoll abgesehen, ist die obige für murine ES-Zellen beschriebene Handhabungs- und Differenzierungsprozedur auch für humane ES-Zellen anwendbar.
30 Während bei murinen Blastozysten nach Beginn der in vitro Differenzierung die äußere Zellschicht (Trophoblast) relativ schnell abgebaut wird, ist dies bei humanen Blastozysten nicht der Fall. Um die innere Zellmasse vor einem Absterben zu bewahren, muß daher der Trophoblast bei der in vitro Differenzierung menschlicher Blastozysten mechanisch entfernt werden (beschrieben von Thomson a.a.O.).
35

b) Alternative Herstellungsmöglichkeiten:

Die in vitro Differenzierung von ES-Zellen ist nicht der einzige Weg, um menschliche Kardiomyozyten zu gewinnen. Kardiomyozyten sind ebenfalls zugänglich durch in vitro Differenzierung von Primordialzellen, Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen, die aus humanen fetalen Ovarien oder Testes gewonnen werden. Die Etablierung humaner pluripotenter Primordialzellen ist z.B. beschrieben bei Shamlott et al., (1998) Proc.Natl.Acad.Sci., 95, 13726.

Außerdem sind Kardiomyozyten zugänglich aus in vitro differenzierten Oozyten, welche mittels Kern-Transfer-Technik manipuliert wurden. Geeignete Methoden sind z.B. beschrieben von Wakayama, T. et al., (1998) Nature, 394, 369; sowie Wilmut, I. et al., (1997), Nature, 385, 810. Dieser Ansatz ermöglicht insbesondere eine autologe Zelltransplantation, d.h. die Möglichkeit zur Gewinnung und Transplantation körpereigener Kardiomyozyten.

Weiterhin sind Kardiomyocyten zugänglich durch Differenzierung von Knochenmarksstromazellen. Ein Verfahren zur Herstellung muriner Kardiomyocyten wird beschrieben von Makino et al., (1999) J. Clin. Invest. 103, 697.

Ein wesentlicher Punkt, der bisher noch nicht eingehend betrachtet wurde, ist die Tatsache, daß jede der zuvor erwähnten in vitro Differenzierungsmethoden zu einem Gemisch verschiedener Zelltypen führt. So liegt beispielsweise bei in vitro differenzierten murinen ES-Zellen der Prozentsatz an myokardialen Zellen nur bei 5%. Für die in vitro Differenzierung humaner Primordial- oder ES-Zellen muß mit ähnlichen Zahlen gerechnet werden. Dies bedeutet, daß immer nur ein Bruchteil der gesamten in vitro differenzierten Zellpopulation dem gewünschten Zelltyp entspricht. Dieser Prozentsatz kann zwar durch geeignete Wachstumsbedingungen, wie der Zugabe chemischer Induktoren, eventuell verdoppelt werden, dennoch kann mit einem derartigen Zell-

gemisch zunächst keine erfolgversprechende Zelltransplantation unternommen werden. Konventionelle Aufreinigungsmethoden sind sehr aufwendig und zeitraubend und bewirken die eingangs beschriebenen unerwünschten Veränderungen der physiologischen Zelleigenschaften. Erst mit Hilfe des erfindungsgemäßen Ansatzes zur Markierung und Reinigung differenzierter Kardiomyozyten kann diese Problem in zufriedenstellender Weise umgangen werden.

- 10 Die Erfindung wird nun anhand folgender Ausführungsbeispiele und unter Bezugnahme auf beiliegende Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 die Markierung und Reinigung ventrikulärer Kardiomyocyten. Das für die Transfektion pluripotenter Zellen (murine bzw. humane ES- bzw. Knochenmarks-Stromazellen bzw. Primordialzellen) verwendete Expressionsplasmid enthält folgende Untereinheiten: (1) ein bi-cistronisches Gen bestehend aus einem für ventrikuläre Kardiomyozyten spezifischen CMV-MLC2v-Promotor, welcher ein verkürztes CD4-Oberflächenprotein und das therapeutisch wirksame VEGF-Gen reguliert; (2) ein durch LoxP-Sequenzen flankiertes eigenständiges PGK-Neo-Gen, welches für die Selektion der positiv transformierten Zellen verwendet wird und durch transiente Expression eines Cre-Expressionsvektor vor der Transplantation entfernt wird; und (3) ein PGK-CTLA4-Ig-Fusionsprotein-Gen, welches als eigenständige Einheit dazu beitragen soll, dem Zelltransplantat gegenüber einer vom Empfängergerewebe ausgehenden Abstoßungsreaktion Immunität zu verleihen.

Nach der Transfektion der Zellen, z.B. mittels Elektroporation, findet eine Selektion positiv rekombinierter Zellen in G418-haltigem Medium statt. G418-resistente Zellklone werden transient mit einem PGK-Cre-Expressionsplasmid transisfiziert, wodurch LoxP-flankierte artfremde Genbereiche aus dem Genom der Zelle entfernt werden, d.h. das

in die Zellen eingeschleuste Genkonstrukt enthält bereits zu diesem Zeitpunkt keine dem Patienten fremden Gene mehr. Nach Herstellung von Embroid Bodies (EBs) folgt die Differenzierung der pluripotenten Zellen, u.a. zu Herzmuskelzellen. Das sich bildende heterogene Zellgemisch wird anschließend einer Einzelzellpräparation unterzogen. CD4-positive Zellen können daraufhin mittels anti-CD4-Antikörper markiert und über die Auftrennung in einem Magnetfeld aufgereinigt werden. Die so gewonnene Zellpopulation besteht aus ventrikulären Kardiomyozyten, welche direkt für Transplantationsstudien verwendet werden können;

Figur 2 die elektrophysiologische Charakterisierung von ventrikulären Kardiomyocyten. (A) EGFP-negative Kardiomyozyten zeigen das typische Aktionspotential früher Zellen mit einem depolarisierten Membranpotential von ca. -56 mV und einem nur kurz anhaltendem Aktionspotential über ca. 86 ms. Außerdem zeigen sie einen negativen chronotropischen Effekt gegenüber Behandlung mit dem muscarinischen Agonisten Carbachol (CCh). (B) EGFP-positive Kardiomyozyten hingegen zeigen typische Eigenschaften des ventrikulären Typs: negatives Membranpotential von ca. -70 mV und eine Dauer des Aktionspotentials von ca. 118 ms. Sie zeigen eine klar erkennbare Plateauphase, welche durch einen langanhaltenden Calcium-Einstrom durch Calcium-Kanäle des L-Typs hervorgerufen wird. CCh zeigt keinen Effekt auf ventrikuläre Kardiomyozyten. Eine Behandlung mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin (Iso) führt jedoch, wie in (C) gezeigt, zu einer Verlängerung des Aktionspotentials, wiederum typisch für Kardiomyozyten des ventrikulären Typs.

Soweit keine gesonderten Angaben gemacht werden, erfolgt die Durchführung der Experimente unter Anwendung molekular- und zellbiologischer Standardmethoden (vgl. z.B. Shambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory).

Beispiel 1

Herstellung eines Expressionsvektors umfassend folgende Teilsequenzfolge:

-//CMV-MLC-2v/CD4/IRES/EGFP//PGK-Neo//PGK-CTLA4-Ig//-

Gen 1 Gen 2 Gen 3

1. Zunächst wird ein CMV-MCL-2v-EGFP-Plasmid hergestellt. Das aus 590 Basenpaaren bestehende CMV-Enhancer Element (Boschardt et al., (1985) Cell 41, 521) wurde mittels PCR aus dem von Clontech erhältlichen Plasmid CMV-EGFP hergestellt und anschließend über die Schnittstellen SacI, BamHI in den Expressionsvektors pEGFP-1 (Clontech) kloniert (pCMV-EGFP). Um den MLC2v-Promotor einfügen zu können wurde dieser zunächst als 2.1 kb KpnI-EcoRI DNA-Fragment aus dem Genom der Ratte isoliert (Henderson et al., (1989) JBC. 264:18142), in die EcoRI, XhoI Schnittstellen des pEGFP-1 inseriert (MLC2v-EGFP), anschließend mittels XbaI, XhoI-Verdau aus diesem herausgeschnitten und in die BamHI, XhoI-Schnittstellen von pCMV-EGFP eingefügt (CMV-MLC2v-EGFP).

- Ein CD4-Expressionsplasmid ist von der Firma Miltenyi Biotec (Deutschland) erhältlich. Die kodierenden Bereiche des um den intrazellulären Teil verkürzten CD4-Moleküls werden an das 3'-Ende des CMV-MLC2v-Enhancer/Promotor-Konstrukts ligiert und, die in 3'-Richtung folgende IRES-EGFP-Kassette wird aus einem von der Firma Clontech bezogenen Expressionsvektor umklontiert. Das so erhaltene bi-cistronische Gen soll die gleichzeitige ventrikelspezifische Expression der Markergene CD4 und EGFP garantieren. CD4 dient später der eigentlichen Aufreinigung der Kardiomyozyten. EGFP dient zur Charakterisierung der durch die Reinigung erhaltenen Zellen. Der oben dargestellte Vektor enthält außerdem ein eigenständiges PGK-Neo-Gen, sowie ein von der Arbeitsgruppe Gainer et al., (1997) Transpl. 63, 1071 beschriebenes CTLA4-Ig-Fusionsgen.

Als Kontrollvektor, um später in der Maus bzw. der Ratte die biologische Wirkung von CTLA4-Ig, zu bestimmen, kommt zusätzlich ein identischer Vektor ohne PGK-CTLA4-Ig-Kassette zum Einsatz.

5

2. Der oben abgebildete, aus 3 Genen zusammengesetzte Vektor wird linearisiert und mittels Elektroporation in murine ES-Zellen und Knochenmarks-Stromazellen des Menschen bzw. der Ratte transfiziert. Knochenmarks-Stromazellen der Ratte werden in an sich bekannter Weise aus den Oberschenkelknochen von Wistar-Ratten isoliert und über einen Perkollgradienten gereinigt. Über Perkollgradienten aufgereinigte humane mononukleäre Knochenmarkszellen können auch von der Firma CellSystems bezogen werden.

15

Die Zellen werden in gelatinisierten Petrischalen gehalten, wobei die ES-Zellen bei 37°C, die Knochenmarks-Stromazellen bei 33°C kultiviert werden. Über die Neomycin-Resistenzkassette lassen sich transformierte Zellen selektionieren. Bei Geneticin (G418)-resistenten ES-Zellklonen wird daraufhin entsprechend der Angaben in der W0 96/16163 durch den Entzug von LIF die Differenzierung induziert. Circa 25 Tage nach Beginn der Differenzierung erfolgt die Reinigung CD4-exprimierender Kardiomyozyten aus den gebildeten Embryoid Bodies.

25

Analog dem von Makino et al. a.a.O, für murine Stromazellen optimierten Protokoll wird auch bei Stromazellen der Ratte und des Menschen die Differenzierung durch die Gabe von 5'-Azacytidin angeregt.

30

3. Für die Reinigung CD4-exprimierender Kardiomyozyten wird zunächst eine Einzelzellpräparation aus den Embryoid Bodies hergestellt. Die typischerweise dafür eingesetzten Enzyme Kollagenase bzw. Trypsin können nicht verwendet werden, da sie das verwendete CD4-Oberflächenmolekül abbauen würden. Abhilfe schafft eine nicht-enzymatische Zelldissoziationslösung, die z.B. von Sigma erhältlich ist. Einzelzellen werden anschlie-

35

ßend mit anti-CD4-Antikörpern inkubiert. Die Antikörper binden an ihr entsprechendes Antigen und markieren somit alle CD4-exprimierenden Zellen. Da die Antikörper ihrerseits an paramagnetische "Mikrobeads" gekoppelt sind, ist es möglich, den Komplex bestehend aus CD4-exprimierendem Kardiomyozyt, anti-CD4-Antikörper und "Mikrobead" in an sich bekannter Weise über ein externes Magnetfeld zu isolieren.

Die durch paramagnetische "Mikrobeads" markierten Zellen werden in einer von der Firma Miltenyi Biotec gelieferten Säule dem Feld eines starken Magneten ausgesetzt. Das Säulenmaterial besteht aus ferromagnetischen Partikeln, welche mit einer zellfreundlichen hydrophilen Beschichtung versehen sind. Die durch "Mikrobeads" markierten Zellen verbleiben zunächst auf der Trennsäule, während nicht markierte Zellen ausgewaschen werden. Das Abschalten des Magneten führt schließlich zur Elution der markierten Zellen. Die gesamte Reinigung dauert ca. 1-2 Stunden. Ein Ablösen der paramagnetischen "Beads" von der Zelloberfläche ist auf Grund ihrer geringen Größe und ihrer Zusammensetzung (Eisenoxid und Polysaccharid) nicht nötig. Die Auftrennung ist daher deutlich schneller und zellschonender als die Auftrennung über den Zellsorter.

4. Die Ausbeute und Beschaffenheit der gereinigten Zellen wird anschließend über die Expression der EGFP-Kassette durch FACS-Analyse bzw. Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Expression von CTLA4-Ig läßt sich mittels monoklonaler anti-CTLA4-Ig-Antikörper und indirekter Immunfluoreszenz ebenfalls in der FACS-Analyse bzw. im ELISA nachweisen.

Beispiel 2

Herstellung eines Expressionsvektors umfassend folgende Teilsequenzfolge:

--//CMV-MLC-2v/CD4/IRES/VEGF//PGK-Neo//PGK-CTLA4-Ig//--

In analoger Weise wie in Beispiel 1 beschrieben wird ein Konstrukt hergestellt, das anstelle der EGFP-Kassette das therapeutische VEGF-Gen (Carmeliet, P., et al. (1999) Nature Med. 5, 495) umfasst. Die auf diese Weise genetisch veränderten Kardiomyozyten fungieren dann als "Carrier", um den Angiogenesefaktor lokal im Myokard zu applizieren.

Allgemein gilt, dass bei der erfindungsgemäßen therapeutischen Verwendung von Expressionskonstrukten, wie z.B. oben beschriebener VEGF-exprimierender Plasmide, alle im transgenen Expressionsvektor vorhandenen Gene humanen Ursprungs sein sollen, um eine Immunreaktion des Körpers zu minimieren. Dies wiederum bedeutet, daß neben dem bereits ersetzten EGFP-Gen auch das noch vorhandene bakterielle Neo-Resistenzgen entfernt werden muß. Die für die Entfernung fremder Gene verwendete Strategie wird in Figur 1 verdeutlicht. Im dargestellten, für therapeutische Ansätze verwertbaren Expressionsvektor, ist die Neo-Kassette durch nicht kopierende sogenannte LoxP-Signalsequenzen flankiert. Werden Transgen-positive ES- bzw. Stromazellen noch vor der Differenzierung in Kardiomyozyten transient mit einem Cre-Expressionsvektor (PGK-Cre) transfiziert, so werden durch die Aktivität der Cre-Rekombinase LoxP-flankierte Genbereiche aus dem Genom entfernt, wobei eine der LoxP-Sequenzen im Genom verbleibt (Selbert, S. (1999) BIUZ, 29, 70).

Ausgehend von obiger konkreter Offenbarung kann der Fachmann unter Zuhilfenahme seines Fachwissens Abwandlungen von den konkret beschriebenen Methoden vornehmen, um diese gegebenenfalls an besondere Erfordernisse pluripotenter Vorläuferzellen verschiedenen Ursprungs anzupassen.

Patentansprüche

1. Expressionskassette dadurch gekennzeichnet, dass sie unter
5 der genetischen Kontrolle eines organ- oder gewebespezifischen Promotors sowie gegebenenfalls eines oder mehrerer weiterer regulatorischer Elemente 3'-stromabwärts vom Promotor die kodierende Nucleotidsequenz wenigstens eines nicht-immunogenen, an der Zelloberfläche lokalisierenden
10 Rezeptors umfaßt.
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Nucleotidsequenz für einen Rezeptor kodiert, welcher wenigstens eine der folgenden Eigenschaften aufweist:
15
 - a) er wird in exprimierter Form vom Immunsystem eines Säugers nicht als körperfremd erkannt;
 - b) er wird unter nativen Bedingungen auf undifferenziierten pluripotenten Vorläuferzellen eines Säugers nicht
20 exprimiert;
 - c) er wird von organ- oder gewebespezifischen Zellen eines Säugers, welche mit Hilfe der Expressionskassette genetisch verändert werden sollen, unter nativen Bedingungen im wesentlichen nicht exprimiert.
- 25 3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nucleotidsequenz des Rezeptors in einem poly-cistronischen Gen enthalten ist, welches außerdem die kodierende Sequenz für wenigstens ein
30 Markergen und/oder wenigstens ein erstes therapeutisches Gen umfaßt.
4. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Rezeptor Affinität
35 zu einem Liganden besitzt.
5. Expressionskassette nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

net, daß der Rezeptor ein Oberflächenantigen ist, das immunologische Affinität zu einem gegebenenfalls immobilisierten Immunglobulin-Molekül besitzt.

- 5 6. Expressionskassette nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Oberflächenantigen das CD4-Antigen oder ein verkürztes Fragment davon, vorzugsweise dessen extrazelluläre und Transmembran-Domäne, ist.
- 10 7. Expressionskassette nach einem der Ansprüche vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem ein reversibel integriertes Resistenzgen umfasst.
- 15 8. Expressionskassette nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Resistenzgen durch LoxP-Sequenzen flankiert wird.
9. Expressionskassette nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Markergen das EGFP-Gen ist.
- 20 10. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß sie außerdem ein zweites therapeutisches Gen umfaßt.
- 25 11. Expressionskassette nach Anspruch 2 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und zweite therapeutische Gen unabhängig voneinander ausgewählt sind unter Genen für Angiogenese-Faktoren, wie insbesondere dem vascular endothelial growth factor (VEGF) Gen, dem basic fibroblast growth factor (bFGF) Gen, dem acidic fibroblast growth factor (aFGF) Gen, dem Angiopoietin-, Activin- oder Follicostatin-Gen, und Immunsuppressorgenen, wie insbesondere dem CTLA4-Ig Fusionsgen.
- 30 12. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.

13. Expressionskassette nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als organ- oder gewebespezifischer Promotor der ventrikelspezifische Myosin-Leichte-Kette-2 (MLC-2v) Promotor verwendet wird.

5

14. Expressionskassette nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie in 5'-3'- Richtung wenigstens eine der folgenden Teilsequenzenfolgen umfasst:

10

a) MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;

b) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor;

15

c) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, PGK-Promotor, CTLA4-Ig Fusionsprotein; und

d) CMV-Enhancer, MLC-2v-Promotor, CD4-extrazelluläre und transmembrane Domäne, IRES, Angiogenesefaktor, LoxP, PGK-Promotor, Resistenzgen, LoxP, PGK-Promotor,

20

CTLA4-Ig Fusionsprotein.

15. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 13 bis 14, deren kodierenden Sequenzen im wesentlichen für humane oder humanisierte Genprodukte kodieren.

25

16. Vektor, umfassend einen Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

30

17. Vektor, umfassend einen Expressionskassette nach einem der Ansprüche 13 bis 15.

18. Verfahren zur Isolierung in vitro differenzierter organ- oder gewebespezifischen Körperzellen eines Säugers, wobei man

35

- a) in pluripotente Vorläuferzellen, vorzugsweise ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen

und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen organ- oder gewebespezifischen Expressionsvektor nach Anspruch 16 einbringt;

- b) transgenpositive Zellen selektioniert;
- 5 c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene Resistenzgene entfernt;
- d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer die gewünschten organ- oder gewebespezifischen Körperzellen umfassenden Zellpopulation induziert und
10 erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und
- e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten Körperzellen mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinigt.

15 19. Verfahren zur Herstellung von ventrikulären Kardiomyozyten, wobei man

- a) in pluripotente Vorläuferzellen, vorzugsweise ausgewählt unter embryonalen Stammzellen, Primordialzellen und Knochenmarks-Stromazellen eines Säugers, einen ventrikelspezifischen Expressionsvektor nach Anspruch
20 17 einbringt;
- b) transgenpositive Zellen selektioniert;
- 25 c) aus den selektionierten Zellen gegebenenfalls vorhandene reversibel integrierte Resistenzgene entfernt;
- d) in den so erhaltenen Zellen die Differenzierung zu einer Kardiomyocyten umfassenden Zellpopulation induziert und erforderlichenfalls eine Einzelzellpräparation herstellt; und
30
- e) die Rezeptor-exprimierenden differenzierten ventrikulären Kardiomyozyten mit Hilfe Rezeptor-spezifischer Liganden affinitätsreinigt.

35 20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß man als reversibel integrierte Resistenzgene LoxP-flankierte Resistenzgene verwendet, und zur Entfer-

nung dieser die Zellen mit einem Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor transient transfiziert.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die embryonalen Stammzellen gewonnen wurden aus

a) Blastozysten oder

b) enukleierten Oocyten, in welche der Kern einer differenzierten adulten somatischen Körperzelle transfertiert wurde.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Rezeptor-spezifischen Liganden an paramagnetische Mikrobeads gekoppelt sind und die Liganden-markierten Zellen in einem Magnetfeld von nichtmarkierten Zellen getrennt werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22 zur Herstellung körpereigener (autologer) humaner Körperzellen, wobei man die pluripotenten Vorläuferzellen aus einem autologen menschlichen Spender gewinnt.

24. Transgene Kardiomyocyten mit einem elektrophysiologisch ventrikulären Eigenschaftsspektrum.

25. Transgene Kardiomyocyten nach Anspruch 24, mit einem, mehreren oder allen der folgenden elektrophysiologischen Merkmalen:

a) Membranpotential im Bereich von etwa $-68,6 \pm 2,8$ mV;

b) Membranpotentiallänge im Bereich von etwa $118,3 \pm 15,2$ ms;

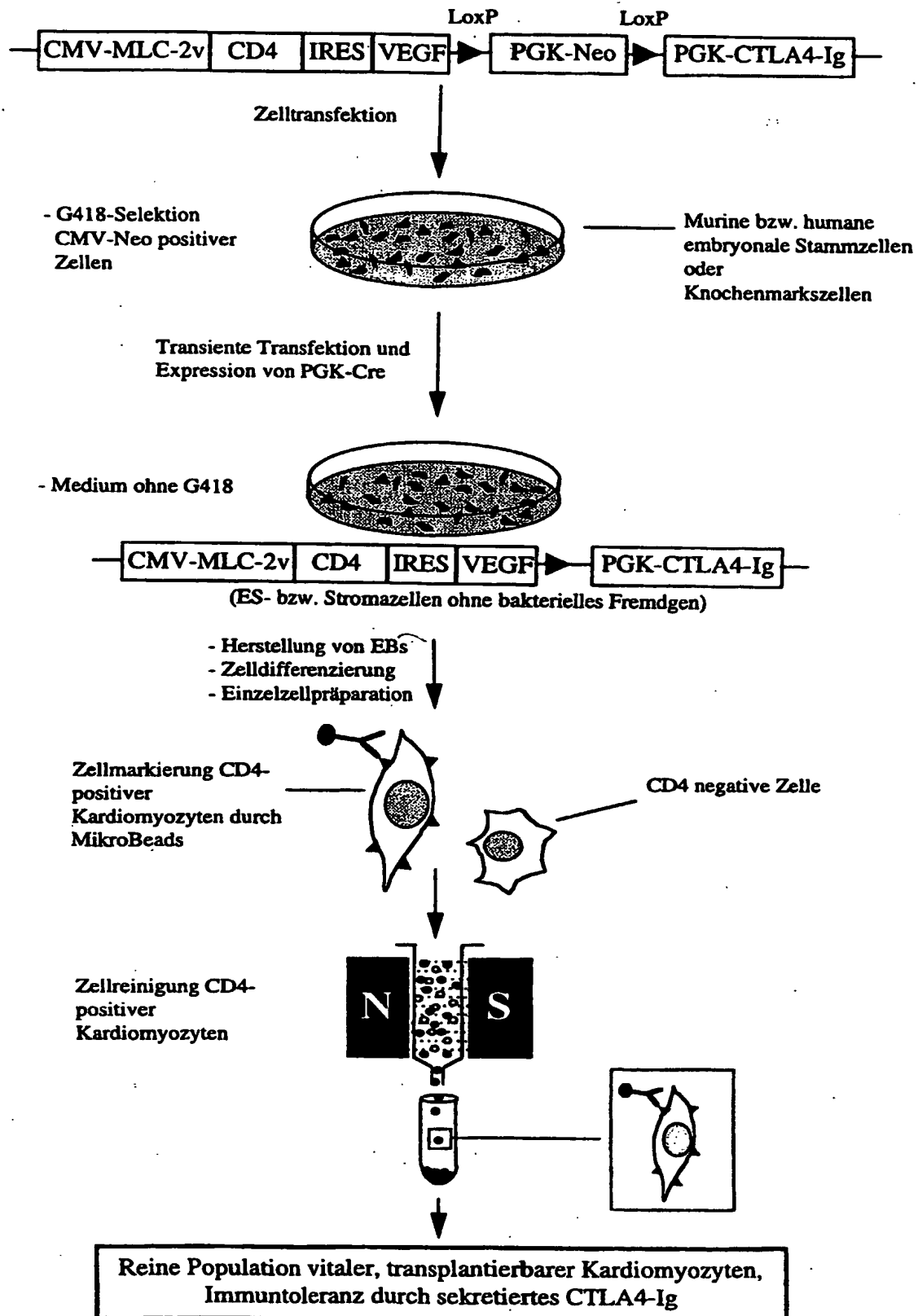
c) Overshoot im Bereich von etwa $34 \pm 3,9$ mV;

d) kein Ansprechen des Membranpotentials und der Aktionspotentiallänge auf 1μ m Carbachol; und

e) Verlängerung des Aktionspotentials durch Gabe von 0,1

μ M Isoprenalin.

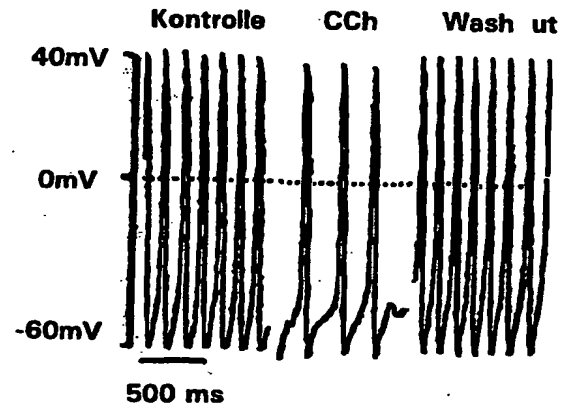
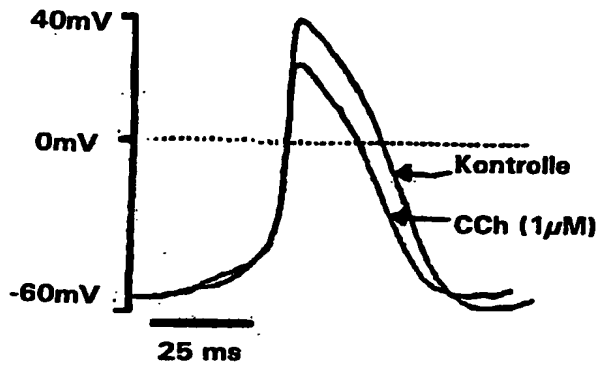
26. Transgene Kardiomyocyten nach Anspruch 25, enthaltend wenigstens einen Vektor nach Anspruch 17.
- 5 27. Transgene Kardiomyocyten erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 19 bis 23.
- 10 28. Transgene Körperzellen erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 20 bis 23.
- 15 29. Verwendung transgener Zellen nach einem der Ansprüche 24 bis 28 zur, vorzugsweise autologen, Zelltransplantation oder zur Gentherapie, wie insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation.
- 20 30. Verwendung einer Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder eines Vektors nach Anspruch 16 oder 17 zur genetischen Veränderung pluripotenter Vorläuferzellen eines Säugers.
- 25 31. Verwendung einer Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder eines Vektors nach Anspruch 16 oder 17 zur Herstellung in vitro differenzierter Körperzellen eines Säugers.

1/2
Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

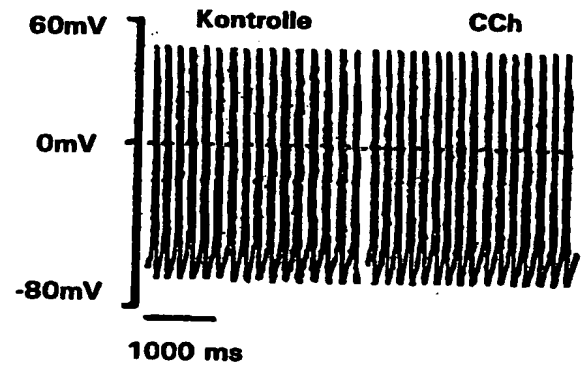
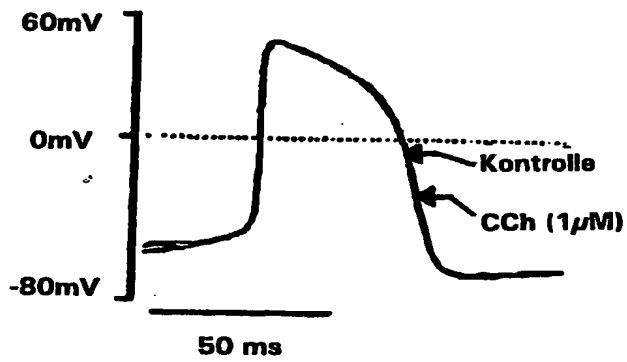
EGFP -

(A)



(B)

EGFP +



(C)

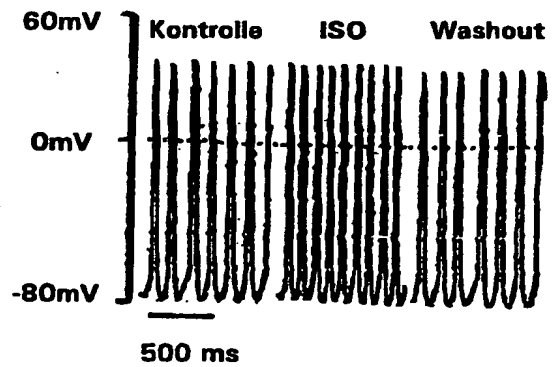
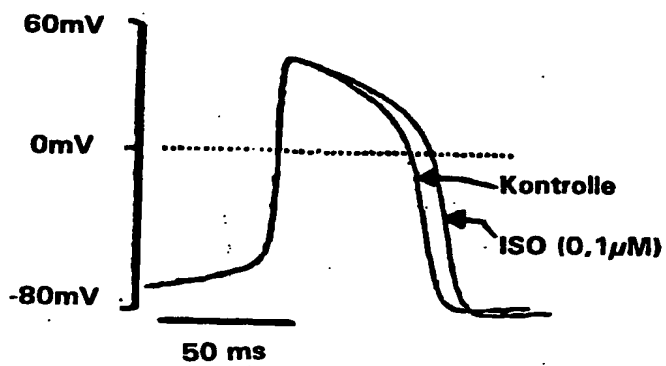


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)